

手性高效液相色谱法拆分和测定缬沙坦对映体

张明浩, 刘立军, 解斌(天大药业(珠海)有限公司, 广东 珠海 519070)

摘要:目的 建立测定缬沙坦对映体的高效液相色谱方法。方法 采用 LiChroCART ChiraDex(250mm × 4mm, 5 μ m)手性柱, pH7.0 磷酸盐缓冲液-甲醇(80:20)为流动相, 流速 0.9 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 250nm。结果 缬沙坦对映体在 0.1 ~ 5 μ g/mL 内呈良好的线性关系, 检测限为 0.02 μ g/mL, 定量限为 0.07 μ g/mL, 平均加样回收率为 98.8%。结论 本方法简便、准确、灵敏, 专属性强, 适用于缬沙坦对映异构体的测定。

关键词: 高效液相色谱; 缬沙坦; 对映体; 手性

中图分类号: R917.796.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2005)06-0483-03

Enantiomeric separation and determination of valsartan by chiral HPLC

ZHANG Ming-hao, LIU Li-jun, XIE Bin (Titan Pharmaceuticals (Zhuhai) LTD., Zhuhai 519070, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a chiral HPLC method for the determination of enantiomer of valsartan. **METHODS** The chromatographic conditions were listed below: LiChroCART ChiraDex(250mm × 4mm, 5 μ m) column, pH7.0 phosphate buffer-methanol (80:20) as mobile phase at 0.9 mL/min, detection wavelength was 250nm, column temperature was 30 $^{\circ}$ C. **RESULTS** The calibration curves were liner between 0.1 ~ 5 μ g/mL. The lowest limit of detection was 0.02 μ g/mL and the limit of quantitation was 0.07 μ g/

mL. The average recovery was 98.8% . **CONCLUSION** This method is convenient, accurate, sensitive, and selective for determination of enantiomer of valsartan.

KEY WORDS: HPLC; valsartan; enantiomer; chirality

缬沙坦(valsartan)是一种口服有效的特异性的血管紧张素Ⅱ(AT₁)受体拮抗剂,临床用于治疗轻、中度原发性高血压,其化学名为(*S*)-*N*-戊酰基-*N*- [2'- (1*H*-四氮唑-5-基) [1,1'-联二苯]-4-基]甲基}-缬氨酸。分子结构见图 1,其中含有一个手性中心,存在一对对映异构体。由于 *R*-对映体药物活性远低于 *S*-对映体,故缬沙坦原料需控制 *R*-对映体的限度。本实验建立的高效液相色谱方法,采用 LiChroCART ChiraDex(250mm ×4mm,5μm)手性色谱柱,以 pH7.0 磷酸盐缓冲液-甲醇(80:20)为流动相,对缬沙坦中的对映异构体进行了拆分和测定,方法简便、灵敏、准确。

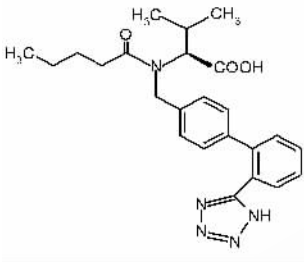


图1 缬沙坦的化学结构式

Fig 1 Chemical structrue of valsartan

1 仪器与试剂

HP1100 液相色谱仪, DAD 检测器, HP 化学工作站; 甲醇为色谱纯; 缬沙坦及其 *R*-对映体样品均由本公司合成室提供。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱: LiChroCART ChiraDex(250mm ×4mm,5μm) 手性柱; 流动相: pH7.0 磷酸盐缓冲液-甲醇(80:20); 流速: 0.9 mL/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 250nm; 进样量: 20μL。

2.2 方法专属性考察

在选择的气相色谱条件下,缬沙坦及其 *R*-对映体保留时间分别为(12.68 ±0.05) min 和(9.71 ±0.05) min,两者得以基线分离,见图 2。而在常规测定缬沙坦有关物质的色谱条件下(使用 C₁₈ 柱),两者在色谱图上完全重合,表明本色谱条件专属性良好。

2.3 线性关系考察

取 *R*-对映体约 10mg,精密称定,置于 1 000mL 量瓶中加流动相溶解并稀释至刻度,作为标准贮备液; 量取贮备液适量,加流动相分别稀释制成 0.1,0.5,1.0,2.0,5.0μg/mL 的对照品溶液,在上述色谱系统条件下,分别进样 20μL,记录色谱图。以峰面积(*A*)为纵坐标,浓度(*C*, μg/mL)为横坐标,绘制标准曲线,试验结果表明: 缬沙坦右旋体在 0.1 ~ 5μg/mL 内呈良好的线性关系,回归方程为 *A* = 54. 8476*C* + 2. 1726, *r* = 0. 9992。

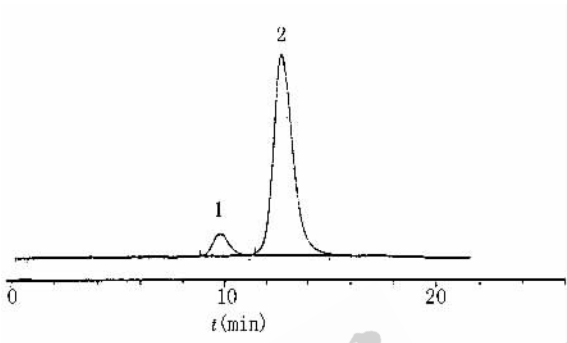


图2 缬沙坦及其 *R*-对映体的手性分离图谱

Fig 2 Chiral separation chromatogram of valsartan and its *R*-enantiomer

1. *R*-对映体; 2. 缬沙坦

1. *R*-enantiomer of valsartan; 2. valsartan

2.4 检出限及定量限

取线性试验中浓度为 0.1μg/mL *R*-对映体溶液,按比例稀释至不同浓度,按 *S*/*N* = 3 测得最低检出限为 0.02μg/mL; 按 *S*/*N* = 10 测得其定量限为 0.07μg/mL。

2.5 对照品进样重复性试验

取浓度为 2μg/mL 的对照品溶液 20μL,注入色谱仪,重复进样 5 次, *RSD* 为 0.52% (*n* = 5)。

2.6 回收率试验

称取已知 *R*-对映体含量的缬沙坦 9 份,每份 10mg,置于 100mL 量瓶中,分成 3 组,分别加入上述 *R*-对映体贮备液 15、20、25mL,流动相稀释至刻度,配制成高、中、低三组不同浓度溶液,各取 20μL 注入色谱仪,记录峰面积,按外标法计算加样回收率,三组平均回收率分别为 99.8%,99.6%,100.1%; *RSD* 分别为 0.38%,0.44%,0.57%,总平均回收率为 99.8%。

表1 回收率试验结果(*n* = 9)

Tab 1 Results of recovery test(*n* = 9)

<i>R</i> -对映体 原有量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)
0.165	0.159	0.323	99.4	99.8
0.161	0.159	0.319	99.7	
0.155	0.159	0.315	100.3	
0.159	0.201	0.359	99.6	
0.162	0.201	0.361	99.4	
0.155	0.201	0.355	99.8	
0.156	0.252	0.407	99.8	
0.164	0.252	0.418	100.4	
0.158	0.252	0.410	100.1	

2.7 样品测定

取三批缬沙坦样品(批号:010701,010702,010801),对其 *R*-对映体含量进行测定,结果分别为 0.48%,0.57% 和 0.53%。典型色谱图见图 3。

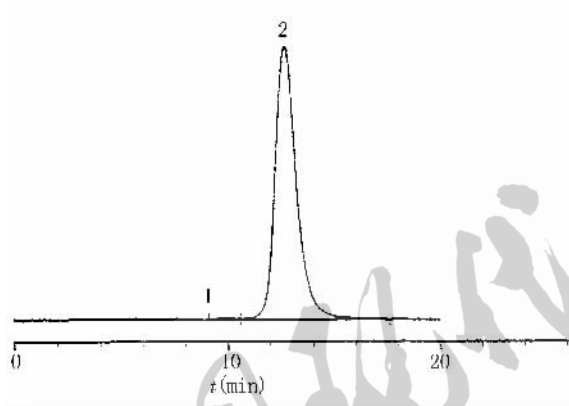


图3 缬沙坦样品对映体测定图谱

Fig 3 The chromatogram of the sample

1. R - 对映体; 2. 缬沙坦

1. R - enantiomer of valsartan; 2. valsartan

3 讨论

国外有文献^[1]报道采用 Chiral AGP 柱, 以 pH7.0 磷酸盐

缓冲液-异丙醇为流动相, 测定缬沙坦对映体, 本研究对该流动相系统作了考察, 另外也考察了磷酸盐缓冲液-异丙醇-甲醇系统及磷酸盐缓冲液-乙腈等系统, 但均无法有效地将缬沙坦对映体进行分离, 后对方法作了进一步摸索和改进, 使用现文中选定的流动相, 获得了良好的分离效果。

理论上, 缬沙坦与其对映体的紫外响应值应基本一致, 在试验中也发现二者的线性曲线几乎完全一致, 因此在能够确定对映体位置的情况下, 也可以用自身对照法在本色谱条件下测定缬沙坦对映体的含量。

参考文献

- [1] Francotte E, Davatz A, Richert P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester [J]. Chromatogr B Biomed, Appl 1996, 686(1):77.

收稿日期: 2004-03-03